

JP06062866A

MicroPatent Report

## MUTANT ASPARTOKINASE GENE

**[71] Applicant:** AJINOMOTO CO INC**[72] Inventors:** SUGIMOTO MASAKAZU;  
OGAWA YURI;  
SUZUKI TOMOKO;  
TANAKA AKIKO . . .**[21] Application No.:** JP05101450**[22] Filed:** 19930427**[43] Published:** 19940308**[30] Priority:** JP 04110292 19920428**[No drawing]****Go to Fulltext****[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a mutant aspartokinase gene originated from microorganism of the genus *Corynebacterium*. **CONSTITUTION:** The present invention relates to an aspartokinase originated from a bacterial strain of the genus *Corynebacterium* to be used in the fermentative production of amino acid, etc., a DNA fragment coding the enzyme, a recombinant DNA containing the DNA fragment and a bacterial strain of the genus *Corynebacterium* containing the recombinant DNA. L- lysine can be produced by culturing the microorganism.

**[51] Int'l Class:** C12N01554 C12N00912 C12P01308 C12N01554  
C12R00113 C12N01554 C12R00115 C12N00912 C12R00115

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-62866

(43)公開日 平成6年(1994)3月8日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/54	Z N A	9359-4B		
9/12		8931-4B		
// C 1 2 P 13/08	A	8931-4B		
(C 1 2 N 15/54		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 9(全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-101450	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成5年(1993)4月27日	(72)発明者	杉本 雅一 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(31)優先権主張番号	特願平4-110292	(72)発明者	尾川 由理 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(32)優先日	平4(1992)4月28日	(72)発明者	鈴木 智子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型アスパルトキナーゼ遺伝子

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネバクテリウム属由来の新規な変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を提供する。

【構成】 アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリネバクテリウム属細菌由来の新規なアスパルトキナーゼ及び該酵素をコードするDNA断片に関し、また、該DNA断片を含有する組み換えDNAに関する。さらに、該組み換えDNAを保有するコリネバクテリウム属細菌に関し、該微生物を培養することを特徴とするL-リジンの製造法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列あるいは配列番号4記載アミノ酸配列の279番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質をコードするDNA断片。

【請求項2】 配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列あるいは配列番号6記載アミノ酸配列の30番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\beta$ サブユニット蛋白質をコードするDNA断片。

【請求項3】 配列表の配列番号12記載の塩基配列を有するものである請求項1記載のDNA断片。

【請求項4】 配列表の配列番号14記載の塩基配列を有するものである請求項2記載のDNA断片。

【請求項5】 請求項1から4のいずれか1項に記載されたDNA断片を含有し、コリネバクテリウム属の微生物中で複製可能な組み換えDNA。

【請求項6】 請求項5に記載された組み換えDNAが、コリネバクテリウム属の微生物に導入されて得られるアスパルトキナーゼ比活性が親株の2-20倍に上昇し、かつアスパルトキナーゼ活性のL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害あるいはL-リジン単独によるフィードバック阻害が実質的に解除された形質転換体。

【請求項7】 請求項6に記載された形質転換体を好適な培地にて培養し、生じたL-リジンを分離することを特徴とするL-リジンの製造法。

【請求項8】 配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列あるいは配列番号4記載アミノ酸配列の279番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質。

【請求項9】 配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列あるいは配列番号6記載アミノ酸配列の30番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\beta$ サブユニット蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリネバクテリウム属細菌由来の新

規なアスパルトキナーゼ及び該酵素をコードするDNA断片に関し、また、該DNA断片を含有する組み換えDNAに関する。さらに本発明は、該組み換えDNAを保有するコリネバクテリウム属細菌に関し、該微生物を培養することを特徴とするL-リジンの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 飼料添加物として用いられているL-リジンは通常、コリネ型細菌のL-リジン生産変異株を使って発酵法により生産されている。現在知られている種々のL-リジン生産菌はコリネ型細菌の野生株の人工変異により作られている。このような人工変異株としては次の様なものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン（以下、AECと略記する）耐性変異株、その成長にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株（米国特許第3708395号及び第3825472号）、D L- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム、 $\alpha$ -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素（デカルボキシラーゼ）または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL-リジン生産変異株（特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号）、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株（特開昭55-9783号、特開昭53-86090号）、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレヴィバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株（米国特許出願第333455号）。

【0003】 さらに、先行技術には組み換えベクターを用いて形質転換されたエシェリヒア・コリ株が開示され、この株はアミノ酸の生産を増加する（米国特許第4278765号参照）。

【0004】 一方、ブレヴィバクテリウム属及びコリネバクテリウム属においては菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド（米国特許願第386980号参照）、遺伝子の菌体への導入方法（特開平2-207791号等）が開示されており、これらの技術を用いたL-スレオニンまたはL-イソロイシン生産菌育成の可能性が開示されている（米国特許願376396号、及び第392145号参照）。また、L-リジン生産菌育成に関しても、ベクタープラスミドにL-リジン生合成に関与する遺伝子を組み込み、菌体内で増幅させる技術（特開昭56-160997号などがある）があるが、遺伝子

をアスパルトキナーゼ（以下AKと記す）と特定し、かつ、L-リジンおよびL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除するようなAK遺伝子上の変異点を明示し、かつその変異がL-リジンの生産性と直接に関与することを明示した例はない。また、変異型AK遺伝子の記載がある例でも、変異型AK遺伝子を安定なプラスミドとして保持させることができていない（Cremers, J. *et al*; Applied and Environmental Microbiology, June 1991, p. 1746-1752参照）。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、コリネバクテリウム属細菌の微生物中のリジン生合成の重要な酵素であるAKをL-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害、さらにリジン単独によるフィードバック阻害を解除した性質のものに改質し、かつその活性を上昇させることにより、L-リジンの生成・分泌速度が高まったものに改良することである。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、コリネバクテリウム属細菌より変異型AK遺伝子を取得することに成功し、本発明を完成させた。すなわち本願発明は、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列あるいは配列番号4記載アミノ酸配列の279番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質及び該蛋白質をコードするDNA断片である。また本願発明は、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列あるいは配列番号6記載アミノ酸配列の30番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除され

るアスパルトキナーゼ $\beta$ サブユニット蛋白質及び該蛋白質をコードするDNA断片である。さらに本願発明は、上記DNA断片を含有し、コリネバクテリウム属の微生物中で複製可能な組み換えDNA、及び該組み換えDNAが、コリネバクテリウム属の微生物に導入されて得られるアスパルトキナーゼ比活性が親株の2-20倍に上昇し、かつアスパルトキナーゼ活性のL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害あるいはL-リジン単独によるフィードバック阻害が実質的に解除された形質転換体である。本願発明は、上記形質転換体を好適な培地にて培養し、生じたL-リジンを分離することを特徴とするL-リジンの製造法である。

【0007】本発明にいうコリネバクテリウム属の微生物とは、バーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第8版599頁（1974）に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌である。また本発明にいうコリネバクテリウム属の微生物とは、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたブレバクテリウム属細菌を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネバクテリウム属（ブレバクテリウム属）の微生物のうち特に以下に述べるようなコリネバクテリウム属（ブレバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。さらに、ミクロバクテリウム属細菌の中にもグルタミン酸を蓄積するものが知られており、これらも本願発明において使用可能である。

【0008】コリネバクテリウム属（ブレバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 13032,
	13060
(ブレバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC 14020
(ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム)	ATCC 13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965
ブレバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC 14066
ブレバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC 14068
ブレバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC 15354

【0009】本発明のコリネバクテリウム属（ブレバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌には上記のよ



うなグルタミン酸生産性を有する野生株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

【0010】AK遺伝子を含むDNA断片の供与菌として野生株を用いた場合、野生型のAK遺伝子を含むDNA断片が取得できる。また、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたAK遺伝子を含むDNA断片を取得するには、AK活性に対するL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株を用いることによって取得することができる。該変異株は、例えば、通常の変異処理法、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)等の変異剤処理を施した細胞群の中から取得することができる。AK活性の測定は、Miyajima, R et al.; The Journal of Biochemistry(1968)63(2), 139-148に記載される方法を用いることができる。

【0011】AK遺伝子を含むDNA断片の供与菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(プレバクテリウム・ラクトファーメンタム)野生株ATCC13869及びATCC13869株より変異処理により誘導されたL-リジン生産菌AJ3463(FERMP-1987)が最も好ましい供与菌である。これらの菌の染色体DNAより野生型AK遺伝子、及びL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子(以下変異型AK遺伝子と記

- |         |      |                |
|---------|------|----------------|
| (1) pAM | 330  | 特開昭58-67699参照  |
| (2) pHM | 1519 | 特開昭58-77895参照  |
| (3) pAJ | 655  | 特開昭58-192900参照 |
| (4) pAJ | 611  | 同上             |
| (5) pAJ | 1844 | 同上             |
| (6) pCG | 1    | 特開昭57-134500参照 |
| (7) pCG | 2    | 特開昭58-35197参照  |
| (8) pCG | 4    | 特開昭57-183799参照 |
| (9) pCG | 11   | 同上             |

【0015】ベクターの開裂は、当該DNAを一箇所切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

【0016】ベクターは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

【0017】このようにして得られた、染色体DNAとベクターとが連結された組み換えDNAをコリネバクテリウム属細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)受容菌細

す)を分離し、コリネバクテリウム属(プレバクテリウム属)細菌中で自律増殖可能なベクターに連結し、コリネバクテリウム属(プレバクテリウム属)細菌細胞に導入する。

【0012】AK遺伝子を単離する方法は、コリネバクテリウム属細菌のAK遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出し(例えば H.Saito and K.Miura Biochem Biophys. Acta 72, 619, (1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで、コリネバクテリウム属細菌細胞内で増殖し得るベクターに接続し、得られた組み換えベクターを用いてコリネバクテリウム属の微生物のAK欠損変異株を形質転換せしめ、AK生成活性を保有するにいたった菌株を単離し、これよりAK遺伝子を分離できる。AK欠損変異株の誘導方法は、上記AK活性に対するL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株の誘導方法と同様にして行うことができる。

【0013】染色体遺伝子を切断するために、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。

【0014】本発明にて使用されうるベクターは、コリネバクテリウム属細菌細胞内において増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977))細胞がDNAを取り込み得る様に増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、組み換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組み換えDNAをDNA受容菌に導入することも可能である。

【0018】プロトプラスト法では上記のパチルス・ズ

ブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68（セルバ社）などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

【0019】あるいはAK遺伝子の取得は、上記のようにして取得された染色体DNAよりPCR (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) によりAK遺伝子を増幅することによっても行える。増幅に用いるDNAプライマーはAK遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有するDNA二重鎖の両3'末端に相補するものを用いる。AK遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該DNA断片をプライマーとして全領域を含むDNA断片を遺伝子ライブラリーよりスクリーニングする必要がある。全領域を増幅した場合には、該DNA断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のバンドを切り出すことによってAK遺伝子を含有するDNA断片を回収できる。

【0020】DNAプライマーとしては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) において既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照) を基にして、AK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACC TGTCACTT-3' と 5'-ACGGAATTCAATCTTACGGCC-3' という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAが最適である。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機model 380Bを使用し、ホスホアミダイド法を用いて (Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成できる。PCR反応は、宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0021】増幅されたAK遺伝子は、上記したようなコリネバクテリウム属細菌細胞内において増殖し得るベクターに接続され、上記したような方法でコリネバクテリウム属細菌細胞に導入される。

【0022】リジンを生産するために、取得されたAK遺伝子が導入され増幅される宿主としては、上記したコリネバクテリウム属グルタミン酸生産性細菌の野生株があげられるが、これ以外にも、ここで構築した組み換えDNAの複製起点と変異型AK遺伝子が機能し、組み換えDNAが複製可能でかつ変異型AK活性の増強が可能な菌なら、全て宿主として利用できる。最も好ましい宿主は、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株であるAJ12

036株 (FERM-P7559) である。

【0023】以上の方法で取得した、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含有する組み換えDNAを保有する形質転換体を培養し、培養液に目的のL-リジンを生成蓄積せしめ、これを採取した。

【0024】使用するL-リジン生産用の培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

【0025】炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0026】窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0027】有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガニオン等が少量添加される。

【0028】培養は好気的条件下で16~72時間実施するのがよく、培養温度は30℃~45℃に、培養中pHは5~7に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。発酵液からの芳香族アミノ酸の採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0029】

【実施例】以下、実施例に基づき、発明の内容を詳細に説明する。

【0030】(実施例1 野生型及び変異型AK遺伝子の取得とコリネバクテリウム用プラスミドの作製) コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生株ATCC13869株、及びそれより変異処理により得られたL-リジン生産性変異株AJ3463 (FERM-1987) より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCR (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) によりAK遺伝子を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照) を基にしてAK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACCTGTCACTT-3' (配列番号15) と 5'-ACGGAATTCAATCTTACGGCC-3' (配列番号16) という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAを合

成した。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成した。PCR反応は、宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅した1643kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI (宝酒造 (株) 製) 及びEcoRI (宝酒造 (株) 製) にて切断した。遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpHSG399 (Takeshita, S et al; Gene(1987), 61, 63-74参照) を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI (宝酒造 (株) 製) 及び制限酵素EcoRIにて切断し、増幅したAK遺伝子断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にプレバクテリウム染色体より増幅されたAK遺伝子断片の接続されたプラスミドを作製した。野生株であるATCC13869由来のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AKY、L-リジン生産菌であるAJ3463由来のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AK9と命名した。

【0031】 p399AKY、p399AK9に、それぞれコリネバクテリウム属細菌中でプラスミドを自律増殖可能にする能力をもつDNA断片 (以下Coryne.-oriと記す) を導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なAK遺伝子を搭載したプラスミドを作製した。Coryne.-oriを取得するために、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌の双方の菌体中で自律増殖可能なプラスミドベクターpHK4を作成した。エシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌中の双方で自律増殖可能なプラスミドベクターは、いくつか報告がある。ここでは、pAJ1844 (特開昭58-216199参照) と、pHSG298 (S. Takeshita et al : Gene 61, 63-74 (1987) 参照) から、新規のシャトルベクターpHK4を構築した。pAJ1844を制限酵素Sau3AIで部分切断し、制限酵素BamHIで完全切断したpHSG298と連結した。連結後のDNAをコリネバクテリウム・グルタミカム (プレバクテリウム・ラクトファーメンタム) AJ12036 (FERM-P7559) に形質転換した。形質転換の方法は、電気パルス法 (特開平2-207791参照) を用いた。形質転換体の選択は、カナマイシン25  $\mu$ g/mlを含むM-CM 2Gプレート (グルコース5g, ポリペプトン10g, 酵母エキス10g, NaCl5g, DL-メチオニン0.2g, 寒天15gを純水1lに含む。pH7.2) にて行った。形質転換体からプラスミドを調製し、大きさの最も小さいものを選択し、pHK4と命名した。このプラスミドは、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌中で自律増殖でき、宿主にカナマイシン耐性を付与する。

【0032】 pHK4を制限酵素KpnI (宝酒造 (株) 製) にて切断し、切断面を平滑末端化する。平滑末端化はDNA

Blunting kit (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー (宝酒造 (株) 製) を接続し、pHK4よりCoryne.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたCoryne.-ori DNA断片を同じくBamHIにて切断したp399AKY、p399AK9に接続し、コリネバクテリウム属細菌中で自律増殖可能でかつAK遺伝子を含むプラスミドを作製した。p399AKY由来の野生型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AKYBと命名し、p399AK9由来の変異型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AK9Bと命名した。p399AK9B、p399AKYB構築の過程を図1に示す。コリネバクテリウム・グルタミカム (プレバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株であるAJ12036株 (FERM-P7559) に変異型AKプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、受託番号 (FERM-P12918) が付与され通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0033】 (実施例2 コリネバクテリウム・グルタミカムの野生型AK及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定) 野生型AK遺伝子を含むプラスミドp399AKY及び変異型AK遺伝子を含むプラスミドp399AK9を調製し、野生型及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーらの方法 (F. Sanger et al : Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977) などがある) によった。p399AKYにコードされている野生型AK遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号1に、p399AK9にコードされている変異型AK遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に記す。変異型AK遺伝子は野生型AKと比べ、1051番目のGがAに変化しているという1塩基の変異のみを有する。AK遺伝子は、同一のDNA鎖に $\alpha$ 、 $\beta$ の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていることが知られているが (Kalinowski, J et al; Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204参照)、相同性から判断して本遺伝子も同一のDNA鎖に $\alpha$ 、 $\beta$ の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていると考えられる。

【0034】 DNA塩基配列より推定される野生型AK蛋白質の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号3に、の $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に示す。DNA配列とアミノ酸配列を同時に示したものは、 $\alpha$ サブユニットは配列表の配列番号7に、 $\beta$ サブユニットは配列表の配列番号9に示す。 $\alpha$   $\beta$ 各サブユニットのオープンリーディングフレーム部の塩基配列を配列表の配列番号11、13に示す。

【0035】 同様にDNA塩基配列より推定される変異型AK蛋白質の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号4に、 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示す。DNA配列とアミノ酸配列を同時に示したものは、 $\alpha$ サブユニットは配列表の配列番号8に、 $\beta$ サブユニットは配列表の配列番号10に示す。



$\alpha$   $\beta$  各サブユニットのオープンリーディングフレーム部の塩基配列を配列表の配列番号12、14に示す。

【0036】尚、各サブユニットとも、開始コドンにGTGが用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。変異型AK遺伝子の変異点は、変異型AK蛋白質がアミノ酸配列において、 $\alpha$ サブユニットにおいて279番目のアラニンがスレオニンに、 $\beta$ サブユニットにおいて30番目のアラニンがスレオニンにというアミノ酸置換を起こしていることを意味する。

【0037】(実施例3 コリネバクテリウム・グルタミカム野生株における変異型AKと野生型AKプラスミドの導入によるL-リジン生産能への効果) コリネバクテリウム・グルタミカム (プレバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株であるAJ12036株 (FERM-P7559) に野生型AKプラスミドp399AKYB及び変異型AKプラスミドp399AK9Bを各々導入した株を作製した。コリネバクテリウムへの遺伝子導入は、電気パルス法によった。宿主のコリネバクテリウム・グルタミカム (プレバ

クテリウム・ラクトファーメンタム) AJ12036株、野生型AKプラスミドを保持するAJ12690株および、変異型AKプラスミドを保持するAJ12691 (FERM-P12918) 株のアスパルトキナーゼ活性を測定した。活性測定は、常法に従った (Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry (1968) 63 (2), 139-148参照)。表1に示す様にAKプラスミド導入によりAKの比活性が約10~15倍に増大していること、及び変異型AKプラスミド導入株についてのみ、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗阻害が解除していることを確認した。表1は、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株AJ12036株、及びそれに野生型AKプラスミドを保持させたAJ12690株、変異型AKプラスミドを保持させたAJ12691株の菌体破砕液のアスパルトキナーゼ比活性、及びそのL-リジン及びL-スレオニンによる相乗阻害の程度を表わしたものである。阻害剤のL-リジン、及びL-スレオニンは各々最終濃度1mMとなるよう添加した。

【0038】

【表1】

菌株	AK比活性 (mU/mg protein)	
	無添加	+1mM L-Lys. +1mM L-thr
AJ12036	19.0	2.6
AJ12690	235.3	34.5
AJ12691	210.5	145.3

【0039】野生株AJ12036、野生型AKプラスミド保持株AJ12690、変異型AKプラスミド保持株AJ12691 (FERM-P12918) のリジン生産能を培養評価した。培養評価はリジン生産培地 (グルコース100g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g, 大豆蛋白加水分解物「豆濃」50ml,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg, ニコチン酸アミド5mg, 及び $\text{CaCO}_3$  50gを純水1lに含む。pH8.0) に植菌し、31.5℃にて72時間往復振とう培養しておこなった。培養後の培養液中のリジン生成量は表2に示す通りである。変異型AKプラスミド導入株により、L-リジン生産能が著しく向上していることがわかる。また、培養終了時のプ

ラスミド保持率をプラスミドの薬剤耐性マーカーであるクロラムフェニコールの耐性を指標にして測定したが、ほぼ100%と極めて高いプラスミドの安定性を示した (表2)。表2は、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株AJ12036株、及びそれに野生型AKプラスミドを保持させたAJ12690株、変異型AKプラスミドを保持させたAJ12691株のL-リジンの発酵生産能、及び培養終了時のプラスミド保持率を測定した結果である。

【0040】

【表2】



菌株	Lys蓄積量 (g/l)	プラスミド保持率 (%)
AJ12036	0	-
AJ12690	2	100
AJ12691	25	98

【0041】(実施例4 コリネバクテリウム・グルタミカムの野生型AK及び変異型AKの酵素解析) AKの酵素活性を測定、評価するにあたり、宿主としてエシェリヒア・コリのAK完全欠損株 Gif106M1 を用いた (Boy, E and Patte, J.C., J. Bacteriol. 112, 84-92 (1972), Theze, J. et al., J. Bacteriol. 117, 133-143 (1974))。コリネバクテリウム属細菌にはAK欠損株が無いために、宿主のAKとプラスミド由来のAKが混在してしまい、正確に測定できないと考えられたためである。多くのコリネバクテリウム属細菌の遺伝子はエシェリヒア・コリ中で発現することが知られており、またこのAK遺伝子は pHSG399 上の lac プロモーター下流に連結されているため、エシェリヒア・コリ中で発現可能であると予想された。

【0042】まず Gif106M1 を実施例1で作製した p399AKY、p399AK9 で形質転換し、以下に示す最少培地 M9 での生育を相補することを確認した。これによりコリネバクテリウム属細菌のAKがエシェリヒア・コリ菌体中で発現、機能することを確認した。

最少培地 M9

	(g/L)
A 20×M9	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	303
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60
NaCl	10
NH <sub>4</sub> Cl	20

B 1M MgSO<sub>4</sub>

C 50% Glucose

D 1g/L Thiamine

別々に滅菌し、A : B : C : D : 水 = 5:0.1:1:0.1:95 の割合で混合する。

【0043】続いてこの菌体より無細胞抽出液を調製

し、AKの酵素活性を測定した。

【0044】AKの酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のリジンやスレオニンを加え、阻害の度合を調べた (図2)。その結果、変異型AKは、リジン単独の阻害は野生型に比べほとんど改善がみられないが、スレオニンによる阻害は、100% 解除され、さらに若干活性化すること、このスレオニンによる阻害解除の結果、リジン+スレオニンの協奏阻害が緩和されていることがわかった (Ki値 0.4mM → 5.0mM)。

【0045】(実施例5 コリネバクテリウム・グルタミカムの阻害解除型AK遺伝子の作製) 実施例4より変異型AKはリジンによる単独阻害の解除が不十分であることが判明したため、変異を導入しこの性質の改良を行うことにした。

【0046】阻害解除型AK遺伝子の作製方法としては、部位特異的変異を用い、実施例2で示した変異点 (279Ala→Thr) を他のアミノ酸に置換することにした。目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としてはPCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology (Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989))), フェージを用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J. Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) などがある。

【0047】変異によって導入するアミノ酸の種類としては、20種類のアミノ酸を極性や分子構造などの各々の性質により分類し、代表的なもの8種 (Arg, Asp, Cys, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val) を選んだ。各々の変異点のアミノ酸変異、及び塩基置換を表3に示す。

【0048】

【表3】

特許変異型表

変異名	変異点及びアミノ酸変化					プラスミド名( <sup>Coryne-</sup> <sub>ori</sub> 導入名)
野生型						p399AKY (p399AKYB)
Thr	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Thr	A*CT	p399AK9 (p399AK9B)
Arg	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Arg	C*G*T	p399AKAR (p399AKARB)
Asp	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Asp	GA*T	p399AKAD
Cys	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Cys	T*G*T	p399AKAC (p399AKACB)
Phe	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Phe	T*T*T	p399AKAF (p399AKAFB)
Pro	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Pro	C*CT	p399AKAP (p399AKAPB)
Ser	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Ser	T*CT	p399AKAS (p399AKASB)
Tyr	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Tyr	T*A*T	p399AKAY (p399AKAYB)
Val	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Val	GT*T	p399AKAV (p399AKAVB)

【0049】変異の導入方法としては、変異が導入される279番目のAla残基のコードンを目的のアミノ酸残基のコードンに置換した23merの合成DNA 8種を考案し(Arg 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG CGT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号17、Asp 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG GAT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号18、Cys 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TGT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号19、Phe 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TTT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号20、Pro 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG CCT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号21、Ser 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TCT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号22、Tyr 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TAT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号23、Val 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG GTT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号24である)、その相補配列と併せて16種類の23mer 一本鎖DNAを合成した。たとえばArg残基を導入する場合、5'-GCCAGGCGAG CGT GCCAAGGTTT-3'なる配列を有する一本鎖DNA、その相補鎖一本鎖DNA、配列

番号15の配列を有する一本鎖DNA、及び配列番号16の配列を有する一本鎖DNAをプライマーとし、p399AKYを鋳型にしてPCR法を行った。非特異的変異の導入を除くため、作製されたDNAから変異点を含む約280塩基対を制限酵素(NaeI-AvaII)を用いて切り出し、p399AKYの該当部位と置換した。置換した領域については塩基配列の確認を行った。

【0050】(実施例6 変異型AK遺伝子8種の酵素解析)実施例4と同様の方法により、Gif106M1を実施例5で得られた各変異型AK遺伝子を含むプラスミド8種で形質転換し、無細胞抽出液を調製し、酵素解析を行った。表4にリジン 5mM、スレオニン 5mM、リジン 5mM +スレオニン 5mM 添加時の阻害解除度、比活性を示す。図3、図4、図5にリジン、スレオニン各濃度添加時の阻害解除度をグラフで示す。

【0051】

【表4】

	比活性(mU/mg protein)	5mM Lys(%)	5mM Thr(%)	5mM Lys+Thr(%)
野生型	15.3	42.3	62.3	9.2
Thr	12.9	47.0	103.5	50.4
Pro	2.8	76.9	126.9	103.8
Cys	15.4	56.3	108.1	17.0
Ser	8.2	52.6	131.6	18.4
Val	21.8	51.1	98.3	52.3
Arg	7.6	40.6	107.2	47.8
Tyr	14.4	14.4	103.6	19.4
Phe	18.7	12.1	103.0	18.2
Asp	1.5			

【0052】Aspのような酸性アミノ酸に変化させた場合はAKは失活したが、その他のいずれのアミノ酸に変化させた場合もスレオニンによる阻害は解除された。それ以外の性質についてはほぼ4つのグループに分けら

れ、実施例2の変異型(Thr)に類似した変異としてはVal 残基導入変異株、Arg 残基導入変異株がある。Cys 残基導入変異株、Ser 残基導入変異株はリジン単独の阻害は野生型と同等であるが、協奏阻害になると阻害が強

化される結果となった。これはスレオニンに対する挙動が、低濃度では活性化されるが、高濃度になると阻害を受ける山型のグラフとなる特徴的な性質であるために協奏阻害が強化したと考えられる。芳香族アミノ酸である Phe 残基導入変異株、Tyr 残基導入変異株のリジン単独の阻害は野生型よりも強化された。Pro は立体構造に与える影響が大きいためか Pro 残基導入変異株は比活性が低い（野生型の約 1/5）、リジンの単独阻害は緩和しており、スレオニンによる活性化の度合も大きくなっている（120% 以上）。そのため協奏阻害も解除された。

【0053】変異導入によってできた酵素の構造の安定性の指標として、熱安定性の検討を行なった。処理条件は野生型 AK の活性が約 80% になる 55℃ 1.5 時間に設定した。Cys 残基導入変異株、Thr 残基導入変異株、Phe 残基導入変異株、Tyr 残基導入変異株、Val 残基導入変異株は野生型よりも安定性が高く、中でも最も安定

性の高いものは Val 残基導入変異株であった（図6）。

【0054】（実施例7 コリネバクテリウム・グルタミカム野生株における変異型 AK 遺伝子 8 種と野生型 AK 遺伝子含有プラスミドの導入による L-リジン生産能への効果）実施例3と同様にコリネバクテリウム・グルタミカム（プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）野生株である AJ12036 株（FERM-P7559）に表3に示す8種のプラスミドを導入した株を作製し、それぞれの株について AK 活性を測定した。表5に示すように比活性は宿主の約20～80倍に増大した。リジン、スレオニンによる阻害解除度は実施例6と同様であり、もっとも阻害解除度の高いものは Pro であり、リジン単独、スレオニン単独、両方による協奏阻害いずれにおいても Thr の変異型を上回った。

【0055】

【表5】

特許930210BOAK

	比活性(mU/mg protein)	5mM Lys(%)	5mM Thr(%)	2mM Lys+Thr(%)
AJ12036	5.6	52.0	87.0	7.0
野生型	316.4	52.7	86.8	6.2
Thr	374.4	58.7	109.1	78.3
Arg	197.4	41.4	106.8	58.6
Cys	267.0	66.5	135.7	60.6
Phe	447.7	14.6	105.0	32.4
Pro	125.0	77.5	123.2	85.2
Ser	406.8	55.0	114.4	37.0
Tyr	425.6	16.1	104.8	32.2
Val	448.9	60.5	103.5	75.5

【0056】さらにこれらの9種の株について実施例3と同様の方法でリジン生産能を培養評価した。培養度の培養液中のリジン生成量は表6に示す通りである。変異型 AK プラスミド導入により L-リジン生産能が著しく向上していることがわかる。特に Cys 残基導入変異株、Ser 残基導入変異株以外の変異では約 25g/l の高い蓄積を示した。また培養終了時のプラスミド保持率もほぼ 100% と高いプラスミドの安定性を示した。

【0057】

【表6】

特許培養

	Lys-HCl(g/l)	プラスミド保持率(%)
野生型	0.00	100
Thr	24.25	100
Arg	24.56	100
Cys	13.41	100
Phe	25.14	100
Pro	25.11	100
Ser	5.72	100
Tyr	25.12	100
Val	25.02	100

【0058】

【発明の効果】プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの AK 遺伝子であって、配列番号3のアミノ酸番号にして 279 位または配列番号5のアミノ酸番号にして 30 位の Ala を酸性アミノ酸以外のアミノ酸に変化さ

せることにより、スレオニンによる阻害が完全に解除し、その結果リジン+スレオニンによる協奏阻害の解除されたAKを取得した。特に Pro に変化させることにより、リジンによる単独阻害が部分的に解除したAKを取得した。同部位を Val、Tyr、Phe に変化させることにより、熱安定性が向上したAKを取得した。コリネ型細菌細胞中でこれら変異型AKの活性を増大させることにより、L-リジンの生産性を著しく上昇させることができた。

【0059】

【配列表】

# 配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AAGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTTCT CGCTTGAGAG TGGCGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAAGTTCTAG AACTTGACGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTGCTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTGCTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGGCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA AGCTGGAATA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAAGTTC TGCTGTTGCC	840
TCCAAGATTT TGGTGTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCTGTGGAAG AAGCAGTCT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC	1020
GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT	1080
GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTTCCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC	1140
GACATCAAGT TCACCTGCC TCGCGCTGAC GGAAGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG	1200
CTTCAGGTTT AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGAGC ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC	1260
CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTTAT GGAAGCTCTG	1320
CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG	1380
ATCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCAATTG ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC	1440
GGCGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT	1500
TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTGGGCCAG GTTATGGCA	1560
CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCCGGTT	1620
CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643

配列番号：2

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

# 配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AAGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240

配列番号：1

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC 13869

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：AJ3463



GGCGGTTCTT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300  
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360  
GAACTTCTAG AACTTGACGC GGCAGTGAAT OCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420  
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480  
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC 540  
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCTGTGTC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600  
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCAACACG 660  
TTGGGTCGTG GTGGTTCCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720  
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT 780  
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAAGTTGC TGCTGTTGGC 840  
TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900  
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960  
CCTGTGGAAG AAGCAGTCTT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC 1020  
GTTCTGGGTA TTTCGATAA GCCAGGCGAG ACTGCCAAGG TTTCCGTGC GTTGGCTGAT 1080  
GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC 1140  
GACATCACGT TCACTGCCC TCGCGCTGAC GGACGCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG 1200  
CTTCAGGTTT AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC 1260  
CTCGTGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG 1320  
CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCGTGCTG 1380  
ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCATTGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC 1440  
GGCGAAGACG AAGCCGTGCT TTATGCAGGC ACCGACGCT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT 1500  
TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG GTTATGCGCA 1560  
CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCGCGTT 1620  
CCGACGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

配列番号 : 3

配列の長さ : 421

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名 : ATCC13869

配列

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala 16  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala 32  
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp 48  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 64  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 80  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 96  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 112  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 128  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 144  
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 160  
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 176  
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 192  
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 208  
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 224  
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 240  
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 256  
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 272  
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 288  
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu 304  
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr 336  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala 352  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu 368  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg 384  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala 400  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr 416  
 Ala Gly Thr Gly Arg 421

配列番号 : 4

配列の長さ : 421

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutami  
cum)

株名 : AJ3463

配列

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala 16  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala 32  
 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp 48  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 64  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 80  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 96  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 112  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 128  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 144  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 160  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 176  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 192  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 208  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 224  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 240  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 256  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 272  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 288  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu 304  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg 320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr 336  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala 352  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu 368  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg 384  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala 400  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr 416  
 Ala Gly Thr Gly Arg 421

配列番号 : 5

配列の長さ : 172

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutami  
cum)

株名 : ATCC13869

配列

Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Va  
 l Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala 16  
 Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser As  
 p Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys 32

	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	
u	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu			48
	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Glu	
y	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr			64
	Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	
a	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu			80
	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	
l	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly			96
	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	
t	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr			112
	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	
p	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu			128
	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Ser	
r	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp			144
	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	His	
s	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly			160
	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Glu	
y	Thr	Gly	Arg							172

配列番号：6

配列の長さ：172

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：AJ3463

配列

Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala	16
Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys	32
Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu	48
Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr	64
Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu	80
Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly	96
Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr	112
Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu	128
Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp	144
Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly	160
Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	172

配列番号：7

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC13869

配列の特徴：mat peptide

存在位置：217..1482

特徴を決定した方法：S

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAT TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGCA GCAAGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG	234
Met Ala Leu Val Val Gln	
1 5	
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC	282

Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val	
10 15 20	
GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT	330
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val	
25 30 35	
GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
55 60 65 70	
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
75 80 85	
TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
90 95 100	
CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
105 110 115	
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
120 125 130	
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
135 140 145 150	
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn	
155 160 165	
GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT	762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala	
170 175 180	
GAC CCG CGC ATC GTT OCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC	810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe	
185 190 195	
GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG	858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu	
200 205 210	
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC	906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg	
215 220 225 230	
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG	954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu	
235 240 245	
GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG	1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys	
250 255 260	
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG	1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu	
265 270 275	



GCT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC 1098  
Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp  
280 285 290  
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC 1146  
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile  
295 300 305 310  
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG 1194  
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu  
315 320 325  
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC 1242  
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp  
330 335 340  
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA 1290  
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro  
345 350 355  
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC 1338  
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn  
360 365 370  
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT 1386  
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg  
375 380 385 390  
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG 1434  
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln  
395 400 405  
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA 1482  
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg  
410 415 420 421  
AGTTTAAAG GAGTAGTTT ACAATGACCA CCATGCGAGT TGTGGTGCA ACCGGCCAGG 1542  
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTGGGAAG AGCGCAATT CCCAGCTGAC ACTGTTCTGT 1602  
TCTTTGCTTC CCCGCTTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C 1643

配列番号：8

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：AJ3463

配列の特徴：mat peptide

存在位置：217..1482

特徴を決定した方法：S

#### 配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60  
TGTATTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCTGT 120  
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180  
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG 234  
Met Ala Leu Val Val Gln  
1 5  
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC 282  
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val  
10 15 20  
GCT GAA CGG ATC GTT GCC AOC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT 330  
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val  
25 30 35

GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
55 60 65 70	
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
75 80 85	
TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
90 95 100	
CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
105 110 115	
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
120 125 130	
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
135 140 145 150	
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn	
155 160 165	
GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT	762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala	
170 175 180	
GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC	810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe	
185 190 195	
GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG	858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu	
200 205 210	
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC	906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg	
215 220 225 230	
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG	954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu	
235 240 245	
GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG	1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys	
250 255 260	
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG	1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu	
265 270 275	
ACT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC	1098
Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp	
280 285 290	
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC	1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile	

```

295          300          305          310
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG   1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu
          315          320          325
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC   1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp
          330          335          340
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA   1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro
          345          350          355
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC   1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn
          360          365          370
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT   1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg
          375          380          385          390
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG   1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln
          395          400          405
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA   1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
          410          415          420 421
AGTTTAAAG GAGTAGTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG   1542
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTGGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTGTT   1602
TCTTTGCTTC CCGCGTTCC GCAGGCGTA AGATTGAATT C   1643

```

配列番号：9

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミカム(Corynebacterium glutami cum)

株名：ATCC13869

配列の特徴：mat peptide

存在位置：964..1482

特徴を決定した方法：S

#### 配列

```

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAA
TATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACG
CATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT 120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GAC
ACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180
GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACA
AAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT 240
GGCGGTTCTT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATT
AGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTC
TGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360
GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCC
GTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCT
CTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAG

```

GCTGGTG	TGCTCACCAC	CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC	GCATTGTTGA	CGTCACACCG	GGT
CGTGTGC	GTGAAGCACT	CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA	TTGTTGCTGG	TTTTCAGGGT	GTT
AATAAAG	AAACCCGCGA	TGTCACCACG	660
TTGGGTCGTG	GTGGTTCTGA	CACCACTGCA	GTT
GCGTTGG	CAGCTGCTTT	GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA	TTTACTCGGA	CGTTGACGGT	GTG
TATACCG	CTGACCCGCG	CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA	AGCTGGAAAA	GCTCAGCTTC	GAA
GAAATGC	TGGAACCTGC	TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTT	TGGTGCTGCG	CAGTGTTGAA	TAC
GCTCGTG	CATTCAATGT	GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT	CTTATAGTAA	TGATCCCGGC	ACT
TTGATTG	CCGGCTCTAT	GGAGGATATT	960
CCT	GTG	GAA	GAA
	GCA	GTC	CTT
	ACC	GGT	
	GTC	GCA	ACC
	GAC	AAG	TCC
	GAA		1008
	Met	Glu	Glu
	Ala	Val	Leu
	Thr	Gly	
	Val	Ala	Thr
	Asp	Lys	Ser
	Glu		
	1	5	
	10	15	
GCC	AAA	GTA	ACC
GAT	AAG	CCA	GGC
Ala	Lys	Val	Thr
Asp	Lys	Pro	Gly
			20
	25	30	
AAG	GTT	TTC	CGT
GAA	ATC	AAC	ATT
Lys	Val	Phe	Arg
Glu	Ile	Asn	Ile
			35
			40
			45
CTG	CAG	AAC	GTC
GGC	ACC	ACC	GAC
Leu	Gln	Asn	Val
Gly	Thr	Thr	Asp
			50
			55
			60
ACC	TGC	CCT	CGC
GCG	ATG	GAG	ATC
Thr	Cys	Pro	Arg
Ala	Met	Glu	Ile
			65
			70
			75
CTT	CAG	GTT	CAG
GTG	CTT	TAC	GAC
Leu	Gln	Val	Gln
Val	Leu	Tyr	Asp
			80
			85



	90		95	
GGC	AAA	GTC	TCC	CTC
ATG	AAG	TCT	CAC	CCA
Gly	Lys	Val	Ser	Leu
Met	Lys	Ser	His	Pro
				Gly
				Val
				100
105				110
ACC	GCA	GAG	TTC	ATG
GAT	GTC	AAC	GTG	AAC
Thr	Ala	Glu	Phe	Met
Asp	Val	Asn	Val	Asn
				Ile
				Glu
				115
				120
				125
TTG	ATT	TCC	ACC	TCT
TCC	GTG	CTG	ATC	CGT
Leu	Ile	Ser	Thr	Ser
Ser	Val	Leu	Ile	Arg
				Glu
				Asp
				130
				135
				140
GAT	CTG	GAT	GCT	GCT
CAT	GAG	CAG	TTC	CAG
Asp	Leu	Asp	Ala	Ala
His	Glu	Gln	Phe	Gln
				Leu
				Gly
				145
				150
				155
GGC	GAA	GAC	GAA	GCC
GGC	ACC	GGA	CGC	TAAAGTTTAA
Gly	Glu	Asp	Glu	Ala
Gly	Thr	Gly	Arg	Val
				Val
				Tyr
				Ala
				160
				165
				170
				172
AGGAGTAGTT	TTACAATGAC	CACCATCGCA	GTT	
GTTGGTG	CAACCGGCCA	GGTCGGCCAG		1550
GTTATGCGCA	CCCTTTTGGGA	AGAGCGCAAT	TTC	
CCAGCTG	ACACTGTTCG	TTTCTTTGCT		1610
TCCCCGCGTT	CCGCAGGCCG	TAAGATTGAA	TTC	
				1643

配列番号 : 10

配列の長さ : 1643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)

株名 : AJ3463

配列の特徴 : mat peptide

存在位置 : 964..1482

特徴を決定した方法 : S

#### 配列

TCGCGAAGTA	GCACCTGTCA	CTTTTGTCTC	AAATATTAAA	TCGAATATCA	ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG	AACGCATCCC	AGTGGCTGAG	ACGCATCCGC	TAAAGCCCCA	GGAACCTGT	120
GCAGAAAGAA	AACACTCCTC	TGGCTAGGTA	GACACAGTTT	ATAAAGGTAG	AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGCA	GCACGTAGAT	CGAAAGGTGC	ACAAAGGTGG	CCCTGGTCGT	ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCC	CGCTTGAGAG	TGCGGAACGC	ATTAGAAACG	TCGCTGAACG	GATCGTTGCC	300

ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAACCTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
TTGGGTGCTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008
Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu	
1 5 10 15	
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCC	1056
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala	
20 25 30	
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val	
35 40 45	
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe	
50 55 60	
ACC TGC OCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys	
65 70 75	
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val	
80 85 90 95	
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val	
100 105 110	
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
115 120 125	
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
130 135 140	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
145 150 155	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA	1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
160 165 170 172	
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CAACATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG	1550
GTTATGCGCA CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG ACACTGTTGG TTTCTTTGCT	1610
TCCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643

配列番号 : 11

配列の長さ : 1263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミカム(Corynebacterium glutami

cum)

株名：ATCC 13869

配列

```
TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATAOOGTC 60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT 120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGGCGA ACGCATTAGA 60
AACGTCGCTG AAGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATGATGTCGT GGTGTCTGTC 120
TCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAACCT CTAGAAGTTG CAGCGGCAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTC TAACGCTCTC 240
GTGCGCATGG CTATTGAGTC CCTTGGCGCA GAAGCTCAAT CTTTCACTGG CTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG CCACGGAAAC GCACGCATTG TTGAAGTCAC ACCGGGTCGT 360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCA GGGTGTAAAT 420
AAAGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGTGGTGGTT CTGACACCAC TGCAGTTGCG 480
TTGGCAGCTG CTTTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTTACT CGGACGTTGA CCGTGTGTAT 540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCA CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTGGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TGGCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCAATCA ATGTGCCACT TCGGTACGC TCGTCTTATA GTAATGATCC CGGCACTTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTGCAACC 780
GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGGCTGCC 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TCCTCTGTGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCGC TGACGGACGC 960
CGTGGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCTGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCCACC 1140
TCTGAGATCC GCATTTCCTG GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA 1200
TTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CGC 1263
```

配列番号：12

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミカム(Corynebacterium glutami

cum)

株名：AJ3463

配列

```
TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATAOOGTC 60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT 120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGGCGA ACGCATTAGA 60
AACGTCGCTG AAGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATGATGTCGT GGTGTCTGTC 120
TCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAACCT CTAGAAGTTG CAGCGGCAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTC TAACGCTCTC 240
GTGCGCATGG CTATTGAGTC CCTTGGCGCA GAAGCTCAAT CTTTCACTGG CTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG CCACGGAAAC GCACGCATTG TTGAAGTCAC ACCGGGTCGT 360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCA GGGTGTAAAT 420
AAAGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGTGGTGGTT CTGACACCAC TGCAGTTGCG 480
TTGGCAGCTG CTTTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTTACT CGGACGTTGA CCGTGTGTAT 540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCA CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTGGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TGGCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCAATCA ATGTGCCACT TCGGTACGC TCGTCTTATA GTAATGATCC CGGCACTTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTGCAACC 780
```

GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCGG ATAAGCCAGG CGAGACTGCC 840  
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
TCCTCTGTGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCGC TGACGGACGC 960  
CGTGGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020  
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCTCGTG GGTGCTGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140  
TCTGAGATCC GCATTTCGGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA 1200  
TTGCATGAGC AGTTCAGCT GGGCGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260  
CGC 1263

配列番号：13  
配列の長さ：516  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA  
起源  
生物名：コリネバクテリウム グルタミンカム(Corynebacterium glutami  
cum)  
株名：ATCC 13869

配列

GTGGAAGAAG CAGTCCTTAC CGGTGTCGCA ACCGACAAGT CCGAAGCCAA AGTAACCGTT 60  
CTGGGTATTT CCGATAAGCC AGGCGAGGCT GCCAAGGTTT TCCGTGCGTT GGCTGATGCA 120  
GAAATCAACA TTGACATGGT TCTGCAGAAC GTCTCCTCTG TGAAGACGG CACCACCGAC 180  
ATCACGTTCA CCTGCCCTCG CGCTGACGGA CGCCGTGCGA TGGAGATCTT GAAGAAGCTT 240  
CAGGTTCAGG GCAACTGGAC CAATGTGCTT TACGACGACC AGGTCGGCAA AGTCTCCCTC 300

GTGGGTGCTG GCATGAAGTC TCACCCAGGT GTTACCGCAG AGTTCATGGA AGCTCTGCGC 360  
GATGTCAACG TGAACATCGA ATTGATTTCC ACCTCTGAGA TCCGCATTTT CGTGCTGATC 420  
CGTGAAGATG ATCTGGATGC TGCTGCACGT GCATTGCATG AGCAGTTCCA GCTGGGCGGC 480  
GAAGACGAAG CCGTCGTTTA TGCAGGCACC GGACGC 516

配列番号：14  
配列の長さ：516  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA  
起源  
生物名：コリネバクテリウム グルタミンカム(Corynebacterium glutami  
cum)  
株名：AJ3463

配列

GTGGAAGAAG CAGTCCTTAC CGGTGTCGCA ACCGACAAGT CCGAAGCCAA AGTAACCGTT 60  
CTGGGTATTT CCGATAAGCC AGGCGAGACT GCCAAGGTTT TCCGTGCGTT GGCTGATGCA 120  
GAAATCAACA TTGACATGGT TCTGCAGAAC GTCTCCTCTG TGAAGACGG CACCACCGAC 180  
ATCACGTTCA CCTGCCCTCG CGCTGACGGA CGCCGTGCGA TGGAGATCTT GAAGAAGCTT 240  
CAGGTTCAGG GCAACTGGAC CAATGTGCTT TACGACGACC AGGTCGGCAA AGTCTCCCTC 300  
GTGGGTGCTG GCATGAAGTC TCACCCAGGT GTTACCGCAG AGTTCATGGA AGCTCTGCGC 360  
GATGTCAACG TGAACATCGA ATTGATTTCC ACCTCTGAGA TCCGCATTTT CGTGCTGATC 420  
CGTGAAGATG ATCTGGATGC TGCTGCACGT GCATTGCATG AGCAGTTCCA GCTGGGCGGC 480  
GAAGACGAAG CCGTCGTTTA TGCAGGCACC GGACGC 516

配列番号：15  
配列の長さ：23  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成 DNA

配列

T C G C G A A G T A G C A C C T G T C A C T T

2 3

配列番号：16  
配列の長さ：21  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成 DNA



配列番号：17 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 ACGGAATTCA ATCTTACGGC C	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	21
	配列 GCCAGGCGAG CGTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG GATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：18 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TGTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TTTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG CCTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：19 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TCTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TTTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TCTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：20 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG GTTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG GTTGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：21 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：22 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：23 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
配列番号：24 配列の長さ：23 配列の型：核酸	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23
	配列 GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成 DNA	23

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、染色体よりPCRにて増幅されたAK遺伝子断片よりp399AKY、p399AKY、更にBrevi.-oriを導入してp399AKYB、p399AK9Bを構築する過程を示したものである。p399AK9Bはp399AKYBと一塩基の違いがある他は全く同様な過程を経て構築されているので、一緒に（）付きで示した。

【図2】図2は野生型と変異型（Thr）AKのリジン、スレオニン、リジン+スレオニンによる阻害について調べたものである。リジン、スレオニン無添加時の活性を100%とし、添加時の活性を活性保持率（阻害解除度）として表わした。

【図3】図3は野生型および変異型8種のAKのリジンによる阻害の解除度について調べたものである。

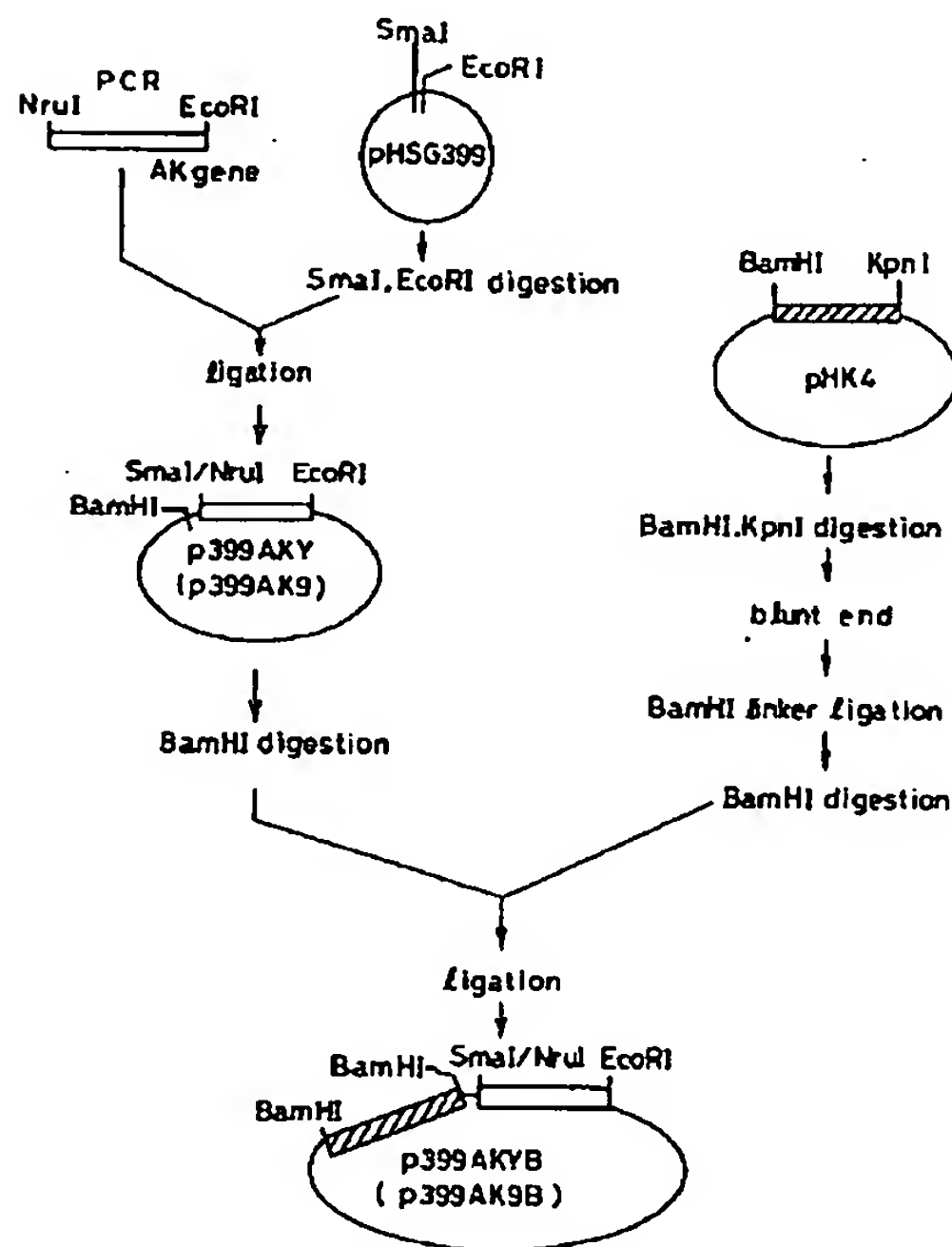
【図4】図4は野生型および変異型8種のAKのスレオニンによる阻害の解除度について調べたものである。

【図5】図5は野生型および変異型8種のAKのリジン+スレオニンによる協奏阻害の解除度について調べたものである。

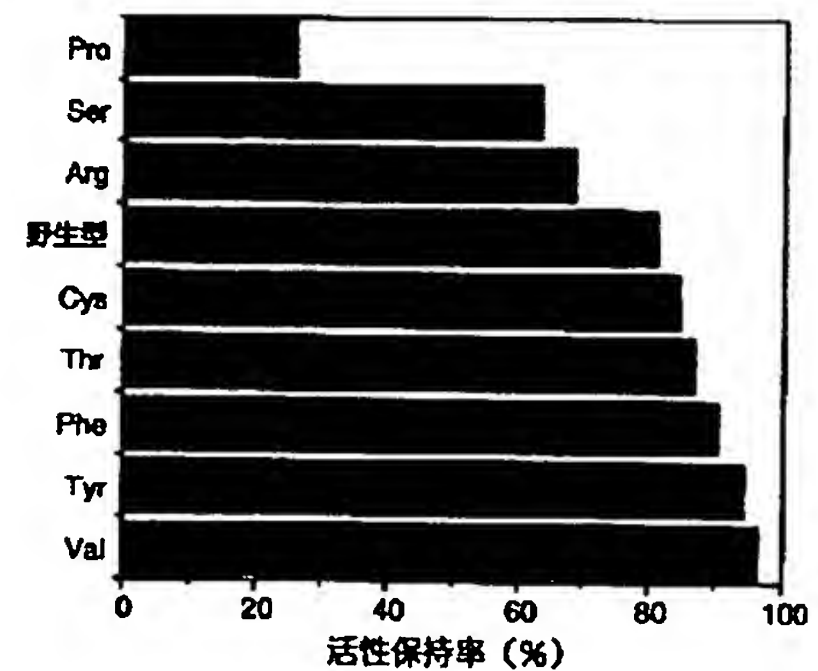
のである。

【図6】図6は野生型および変異型8種のAKの熱安定性について調べたものである。55℃、90分処理後の活性保持率を%で表わした。

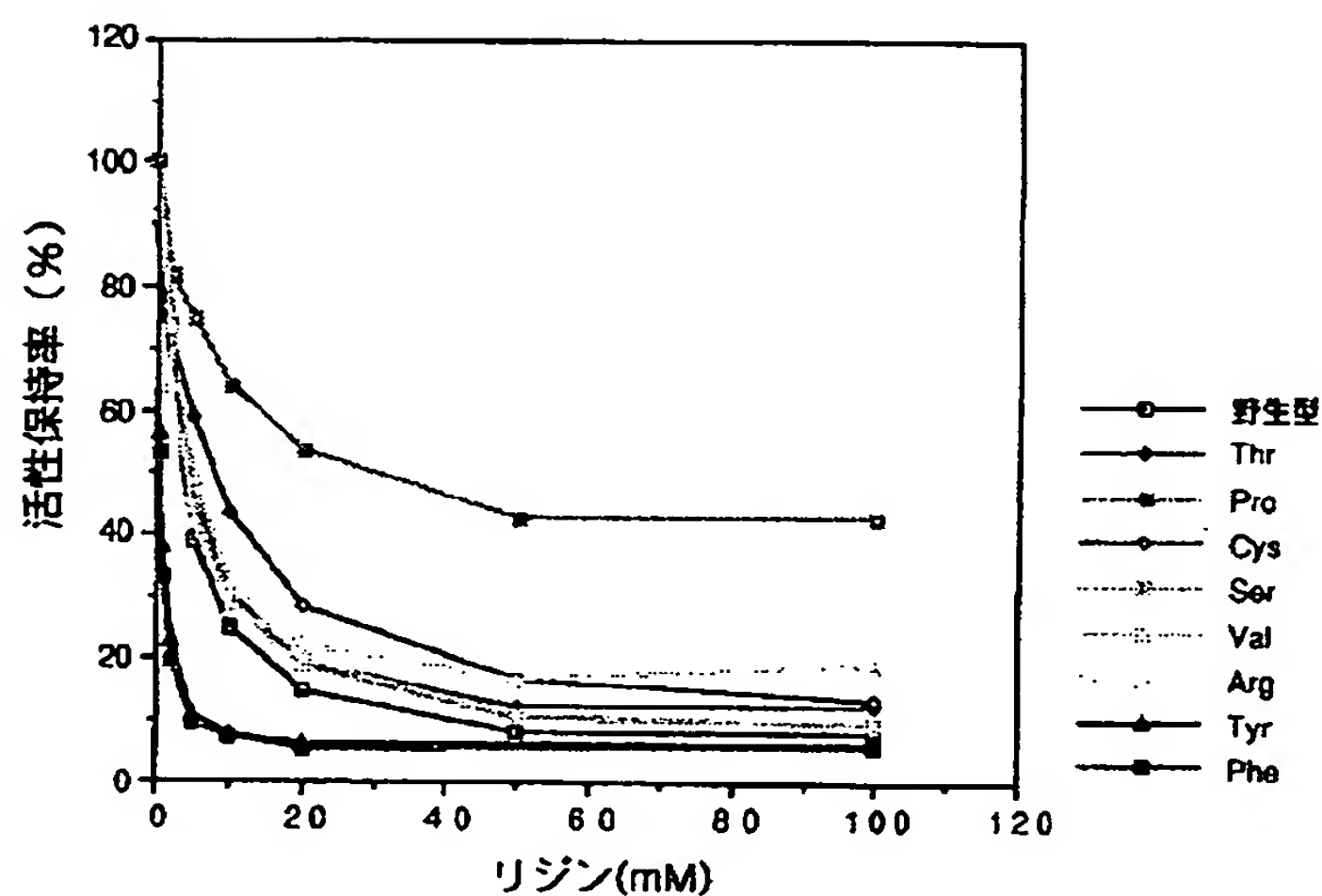
【図1】



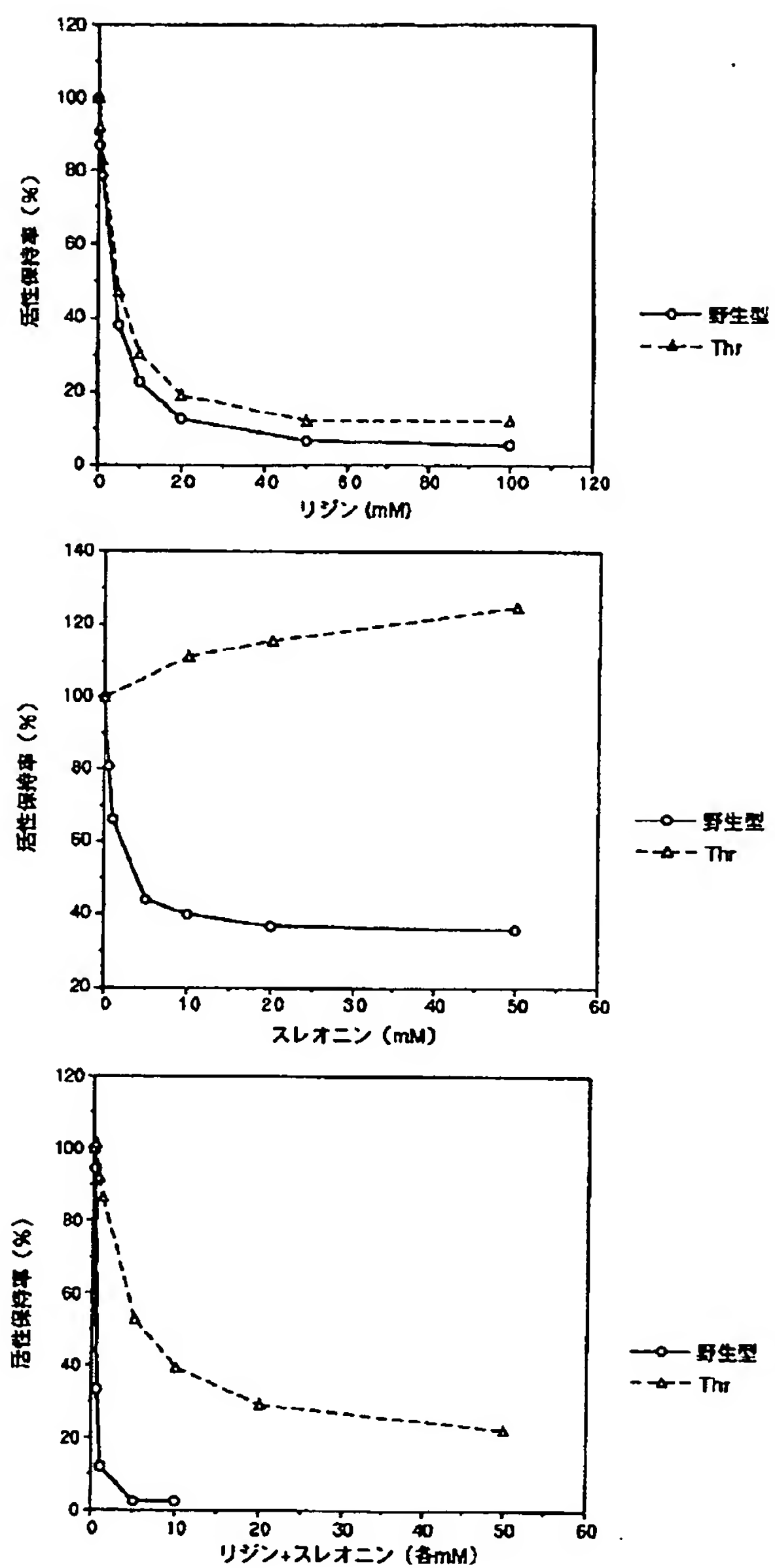
【図6】



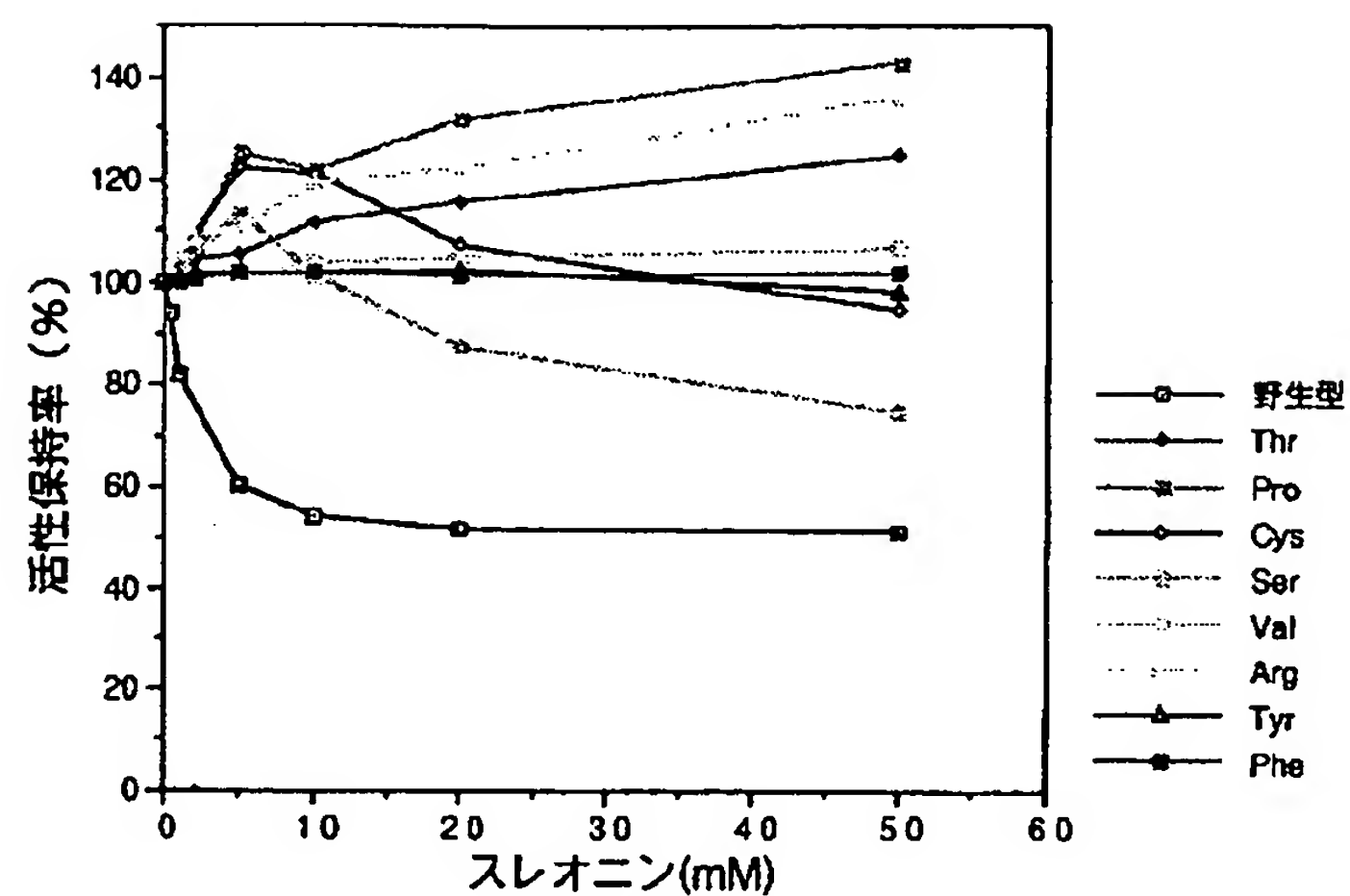
【図3】



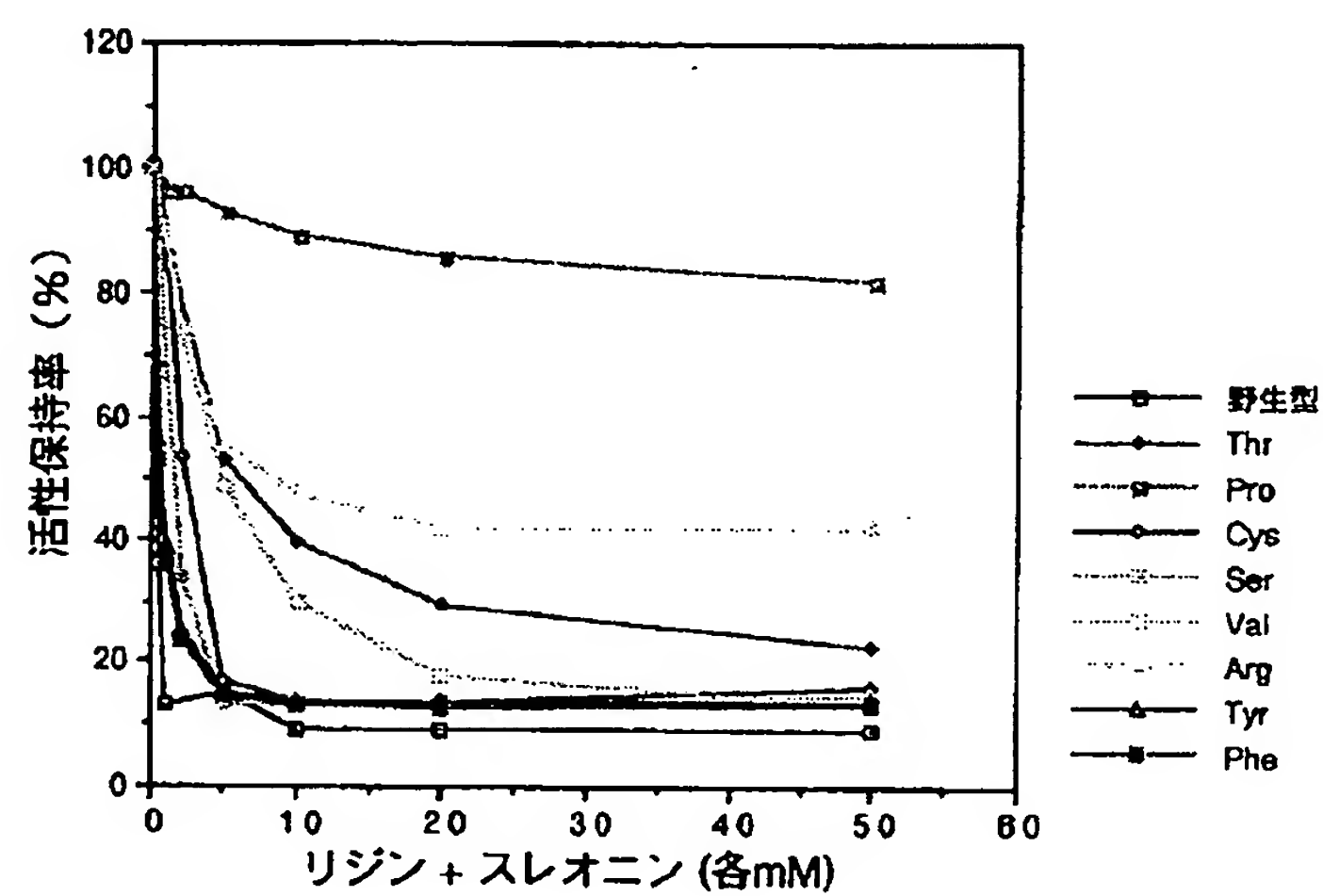
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 田中 朗子  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の  
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 松井 裕  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の  
素株式会社中央研究所内